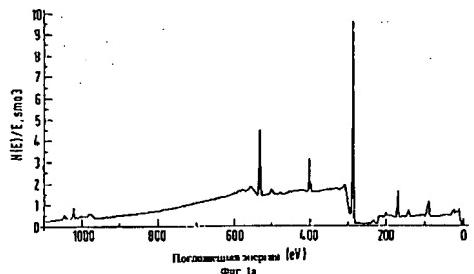


R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2



R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2



(19) RU ⁽¹¹⁾ 2 173 563 ⁽¹³⁾ C2
(51) Int. Cl.⁷ A 61 L 27/00, 29/00, 31/00, C
09 D 105/08, 101/00, 103/00, 105/00

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

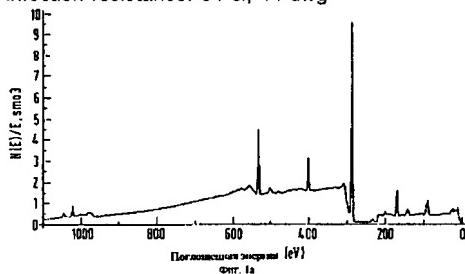
- (21), (22) Application: 97115374/04, 07.02.1996
(24) Effective date for property rights: 07.02.1996
(30) Priority: 07.02.1995 IT PD 95A000030
20.12.1995 IT PD 95A000243
(43) Application published: 10.07.1999
(46) Date of publication: 20.09.2001
(85) Commencement of national phase: 08.09.1997
(86) PCT application:
EP 96/00509 (07.02.1996)
(87) PCT publication:
WO 96/24392 (15.08.1996)
(98) Mail address:
119034, Moskva, Prechistenskij pereulok 14,
str.1, 4 ehtazh, "Goulingz Internehshni
Ink.", Dement'evu V.N.

- (71) Applicant:
FIDIA ADVANSED BIOPOLIMERS, S.R.L. (IT)
(72) Inventor: MORRA Marko (IT),
KASSINELLI Klara (IT), BENEDETTI Luka
(IT), KALLEGARO Lanfranco (IT)
(73) Proprietor:
FIDIA ADVANSED BIOPOLIMERS, S.R.L. (IT)
(74) Representative:
Dement'ev Vladimir Nikolaevich

(54) METHOD OF APPLYING, ONTO OBJECT SURFACES, COATING BASED ON HYALURONIC ACID, ITS DERIVATIVES AND SEMISYNTHETIC POLYMERS

(57) Abstract:
FIELD: medicinal polymers. SUBSTANCE:
invention provides coating based on
hyaluronic acid, its derivatives or other
naturally occurring or semisynthetic
polymers for application in surgery, health
protection, and diagnostics areas. Methods
allow reliably joining these polymers with
surfaces of objects made from a variety of
materials. Properly treated surfaces are
characterized by high degree of wettability
and are capable to inhibit adhesion of cells
or bacteria, which are present in biological
fluids. Coating procedure consists in (i)
interaction of hyaluronic acid or its
derivative with alkoxysilane coupling agent
in aqueous medium or in organic solvent in
presence of condensing or a bifunctional

agent to give solution containing reaction
product; (ii) plasma treatment of surface;
(iii) applying solution (i) onto this
surface; and (iv) removal of solution from
surface after reaction product (i) is
reacted with surface. EFFECT: imparted
infection resistance. 34 cl, 14 dwg



R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

R U 2 1 7 3 5 6 3 0 2

Изобретение относится к способам покрытия внешних поверхностей предметов гиалуроновой кислотой и ее производными или другими природными или полусинтетическими полимерами, может быть применено в области хирургии, медико-санитарной помощи и в диагностике. Согласно такому способу можно соединить полимер стабильно с поверхностями предметов, изготовленных из широкого круга материалов. Поверхности, обработанные способами, описанными в данном изобретении, характеризуются высокой смачиваемостью и скольжением в водной среде и улучшенными свойствами при взаимодействии с биологическими фазами. Например, они способны ингибировать адгезию клеток или бактерий, присутствующих в биологических жидкостях.

Гиалуроновая кислота является природным мукополисахаридом, присутствующим в различных концентрациях практически во всех тканях. Как известно любому специалисту, водные растворы гиалуроновой кислоты или ее солей, или производных, или вообще полисахаридов характеризуются значительной вязкостью, скольжением и способностью снижать трение, свойством, которое определяет наличие и функцию полисахаридов, относящихся к тому же семейству, что и гиалуроновая кислота, в организмах людей и животных (Michels R.G. et al. Sodium hyaluronate in anterior and posterior segment surgery. Physicochemical of Hyaluronic Acid, 1-15, 1989).

Благодаря этим качествам полисахариды, относящиеся к тому же семейству, что и гиалуроновая кислота (природные полисахариды и полисахариды, полученные химическим синтезом из природных соединений), были подробно изучены. В частности, значительные усилия были затрачены на идентификацию методов, при помощи которых тонкие слои гиалуроновой кислоты (европейский патент N 0138572) или ее производных (патент США N 4851521) могут быть закреплены на поверхности других материалов. Цель этого исследования состояла в получении предметов с улучшенными поверхностными свойствами при сохранении всех характеристик материала, из которого они изготовлены (этот материал далее будет называться субстратом). В частности, благодаря высокой степени гидрофильности гиалуроновая кислота и ее производные особенно пригодны для изготовления предметов, чье использование требует, чтобы их поверхности были стойкими к адгезии к клеткам, находящимся в тканях или биологических жидкостях. Такие поверхности представляют особый интерес в областях, где адгезия между материалом и клетками может причинить вред биологическим тканям (Kaufman H.E. et al.- Science, 189, 525, 1977).

Модификация поверхностей материалов гиалуроновой кислоты или ее производными оказалась затруднительной для многих исследователей.

Одним из первых свойств, которые бросаются в глаза, является то, что растворы гиалуроновой кислоты имеют довольно большое поверхностное натяжение, равное или немножко меньшее соответствующей величины для воды (F.H. Silver et al.

Journal of Applied Biomaterials, 5, 89, 1994). Хорошо известно, что для получения равномерного покрытия нанесением раствора наносимый материал должен иметь поверхностное натяжение, которое меньше поверхностного натяжения субстрата, чтобы покрытие было целым и ровным. Более того, почти все полимерные материалы, которые можно использовать в качестве субстратов, обладают поверхностным натяжением, которое меньше, чем у воды, свойством, которое препятствует образованию тонкого слоя гиалуроновой кислоты, равномерно покрывающего субстрат (Garbassi F. et al. Polymers Surfaces, from Physics to Technology, Wiley, Chichester, 304, 1994). Следует отметить, что гиалуроновая кислота растворяется в воде, поэтому любые предметы, полученные путем покрытия их слоем раствора гиалуроновой кислоты, мгновенно теряют это покрытие при контакте с водными растворами, включая биологические жидкости. Производные гиалуроновой кислоты, даже те, которые не растворяются в воде, в любом случае являются чрезвычайно гидрофильными и сильно склонны разбухать в присутствии воды или водных растворов (H. N. Joshi and E.M. Topp, International J. of Pharm. 80 (1992) 213-225). В водных средах это свойство быстро вызывает ухудшение гидрофильного поверхностного слоя, нанесенного на субстрат просто путем использования раствора. По этим причинам исследовались методы, использующие химическую связь между поверхностью субстрата и гиалуроновой кислотой или ее производными. Наличие стабильной химической связи предотвращает растворение поверхностного слоя и придает прочность и долговременность поверхности предмета. Реализация химической связи между субстратом и поверхностным слоем требует наличия у обоих подходящих химических групп. В то время как химическая структура гиалуроновой кислоты обеспечивает наличие различных подходящих функций, поверхность большинства синтетических материалов не особенно подходит для этого типа реакции. По этой причине способы создания химической связи между поверхностным слоем гиалуроновой кислоты или ее производных и синтетическим субстратом обычно состоят из двух стадий. На первой стадии в поверхность вводятся подходящие химические группы, затем на второй стадии начинается реакция между химическими группами, введенными в поверхность субстрата, и гиалуроновой кислотой или ее производными. Например, в патентах США 4657820, 4663233, 4722867, 4801475, 4810586, 4959074, 5023114 и 5037677 описано использование промежуточного слоя между субстратом и покрытием на основе гиалуроновой кислоты. Этот промежуточный слой физически соединяется с субстратом и содержит химические группы, которые пригодны для образования связи с химическими группами гиалуроновой кислоты. Для облегчения распределения и обеспечения ровного покрытия гиалуроновой кислоты на субстрате, как описано в вышеуказанном патенте, используется альбумин, который при добавлении к гиалуроновой кислоте улучшает ее

C 2 1 7 3 5 6 3 C 2
R U

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

способность равномерно смачивать промежуточный слой.

В других источниках описано использование плазменной технологии для введения в субстрат реакционноспособных групп. Этот метод (Garbassi F. et al. *Polymer Surfaces, from Physics to Technology*, Wiley, Chichester, 6, 1994) дает возможность модифицировать поверхность полимерных материалов быстро и эффективно. Например, в международной заявке WO 94/06485 описано введение функциональных групп в поверхность полимерного материала путем обработки плазмой метанола. Затем обработанный материал приводят в контакт с раствором эпихлоргидрина, что гарантирует присутствие групп, пригодных для реакции с полисахаридами.

Другая статья (*Acta Phisiologica Scandinava Materials Research*, 18, 953, 1984, Elan et al.) описывает обработку кислородной плазмой с последующим нанесением 3-

глицидоксипропилтриметоксисилана.

Поверхности, обработанные таким образом, используют для образования ковалентных связей с полисахаридами.

Хотя вышеуказанные методы в общем являются удовлетворительными, они, тем не менее, каждый сталкивается при осуществлении с трудностями. В частности, использование промежуточного слоя требует, чтобы его состав был адаптирован к природе субстрата, чтобы как можно в большей степени увеличивать адгезию. В случае изготовления предметов, состоящих из новых материалов или редко используемых материалов для определения наиболее подходящего состава для промежуточного слоя требуется много времени и усилий. Если предметы, на которые нужно нанести покрытия, состоят из разных материалов, трудно нанести подходящий промежуточный слой на каждый компонент, при этом нужно избежать перекрывания и попадания промежуточных слоев в неподходящие места. Более того, может быть нежелательным использовать для улучшения смачиваемости субстрата альбумин, особенно в случае изделий, предназначенных для биомедицинских целей.

С учетом других вышеуказанных примеров предпочтительно избегать использования эпихлоргидрина и 3-глицидоксипропилтриметоксисилана, так как известно, что эти два соединения очень вредны для здоровья. В действительности, согласно классификации вредных веществ, выпущенных Европейским Союзом, эти соединения кодируются как "R45" и "R40" соответственно, что означает риск для здоровья, как сообщается в большинстве каталогов на химические продукты и реагенты. Это обозначение указывает, что в первом случае продукт может вызвать рак, и во втором случае, что есть опасность возникновения необратимых эффектов.

В общем число реакций с участием функциональных групп, иммобилизованных на поверхности больших молекул, таких как полисахариды, очень ограничено явлением, общизвестным как пространственное затруднение. Большой размер молекул полисахарида предотвращает контакт или

препятствует контакту между реакционноспособными группами, поэтому вероятность эффективного протекания реакции очень мала.

Другие способы, описанные в уровне техники, включают реакцию между полисахаридами и аминогруппами. Японский патент JP 04126074 раскрывает применение обработки аммониевой плазмой для введения аминогрупп на поверхность полимерных субстратов. Затем аминогруппы реагируют с гиалуроновой кислотой или другими полисахаридами при использовании агента конденсации. В патенте США N 4810784 поверхности предмета, изготовленного из полимерного материала, обрабатывают реакционноспособными растворами, так чтобы ввести отрицательные электростатические заряды в саму поверхность. Обработанную таким способом поверхность приводят в контакт с водным раствором полизэленимина (ПЭИ), полимера, характеризующегося наличием аминогрупп и положительного электростатического заряда. Взаимодействие между различными зарядами связывает ПЭИ с модифицированной поверхностью с получением поверхности, обогащенной аминогруппами. Гепарин и другие полисахариды связывают с аминированной поверхностью после обработки растворами нитритов. В органической химии известен тот факт, что действие нитратов вызывает образование альдегидных групп. Эти группы реагируют с аминированной поверхностью, необратимо связывая полисахарид с самой поверхностью. Ту же реакцию используют, когда вводят альдегидные группы путем слабого окисления периодатом (C. Brink et al.- *Coloids and Surfaces*, 149, 66, 1992).

Более того, реакция между ПЭИ и любыми альдегидными группами, находящимися или введенными в полисахарид, иногда используется для связывания полисахарида в различных конформациях с поверхностью предмета (E. Ostenberg et al., *Journal of Biomedical Materials Research*, 29, 741 (1995)). В патенте US N 5409696 описана модификация поверхности материалов плазмой, содержащей пары воды, и последующая реакция обработанной поверхности ПЭИ. Полученная таким образом поверхность обогащена аминогруппами и способна связывать гепарин и другие полисахариды необратимо при действии конденсирующих агентов. Обычно реакция между карбоксильными группами полисахарида и аминогруппами поверхности промотируется этилдиметиламинопропилкарбодиимидом (ЭДК). Использование этого способа для покрытия внутренней поверхности трубок, которые предназначены для контактирования с кровью, описано P.V. Narayanan (*Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 6, 181, 1994).

Исследования показали, что способы, описанные в указанных патентах и статьях, не вполне удовлетворяют требованиям, предъявляемым к изготовлению предметов с поверхностями, модифицированными гиалуроновой кислотой или ее производными. В действительности введение функциональных групп аминного типа при помощи аммонийной плазмы, как описано в

C 2 1 7 3 5 6 3 R U

R U
2 1 7 3 5 6 3 0 2

японском патенте JP 04126074, является не очень используемым на практике. Специалисты в этой области знают, что плотность функциональных групп, введенных этим методом в поверхность субстрата, сравнительно невелика и зависит в значительной степени от точной геометрии реактора, используемого для обработки плазмы, от природы субстрата, от наличия добавок и/или загрязняющих веществ на его поверхности и внутри него и от условий хранения субстрата до и после его обработки. По этой причине метод трудно применять в промышленности. Этот отрицательный аспект признается всеми специалистами в данной области и в вышеуказанных патентах США N 4810874 и 5409696 он преодолевается путем использования ПЭИ, который позволяет получать высокую плотность аминогрупп. Хотя эти способы эффективно решают проблемы, связанные с первой стадией процесса, то есть с введением реакционноспособных групп в поверхностный слой материала, они не так эффективны на второй стадии, которая включает связывание гиалуроновой кислоты или ее производных с поверхностью. В действительности, как ранее указано, в патенте США N 4810874 рекомендуется активация гепатина или других полисахаридов химической обработкой. Следовательно, нельзя использовать полисахарид, а необходимо вначале модифицировать его химическим способом, что требует лишних расходов по времени, реагентам, трудозатратам на переработку отходов. Более того, в отличие от других полисахаридов гиалуроновая кислота только слегка чувствительна к реакциям частичного окисления, которое позволяет ввести в полисахарид реакционноспособные группы типа альдегидных (J.E. Scott and M.J. Tigwell, Biochem. J., 173, 103, 1978; B.J. Kvam et al., Carbohydrate Research, 230, 1, 1992). Что касается патента США 5409696, то когда осуществляют процесс, описанный в нем, он не приводит к получению поверхностной структуры, способной в наибольшей степени использовать свойства, свойственные гиалуроновой кислоте. С другой стороны, когда используют способ, описанный в патенте США 5409696, как показано в сравнительном опыте, приведенном в данном описании, нельзя получить поверхностные структуры, способные ингибиовать адгезию клеток. Похожие результаты наблюдаются, когда вместо самой гиалуроновой кислоты используют ее водорастворимые полусинтетические эфиры (EPA 0216453). Очевидно, когда используют этот процесс, способ, по которому образуется связь между аминированной поверхностью и полисахаридом, не позволяет наиболее полно использовать гидрофильные свойства гиалуроновой кислоты или ее производных.

Не следует пренебрегать и тем, что способ, являющийся предметом патента США 5409696, можно применить только при поверхностной модификации полимерных материалов, как указано в его названии "Обработанные плазмой с радиочастотой полимерные поверхности, содержащие иммобилизованные антитромбогенные агенты" и как следует из указаний, содержащихся в патенте. В общем

5 биомедицинской и хирургической практике часто используются керамические или металлические материалы, поэтому полагают, что процессы модификации можно применить также к таким субстратам. Данное описание показывает, что должен быть создан метод, согласно которому может быть образована просто и надежно химическая связь между субстратами любой природы и гиалуроновой кислотой или ее производными, таким образом, что присущие им характеристики могут быть реализованы наиболее полно.

Сущность изобретения

10 Данное изобретение касается способов покрытия биомедицинских предметов тонким слоем гиалуроновой кислоты, ее производного или полусинтетического полимера, причем тонкий слой стабильно связан с подложкой. Таким образом, получают композиционную структуру, основа которой характеризуется свойствами материала, 15 используемого для изготовления предмета, а свойства поверхности определяются тонким слоем гиалуроновой кислоты, ее производного или указанного полусинтетического полипептида. Указанные свойства могут придать высокую степень гидрофильности поверхностям материалов, обработанных согласно способам по изобретению. Например, поверхности предметов, обработанных способами по изобретению, способны предотвращать 20 адгезию клеток, присутствующих в биологических жидкостях и снижать адгезию бактерий. Более того, покрытие предмета материалом природного происхождения согласно настоящему изобретению обеспечивает лучшие свойства при взаимодействии с биологическими фазами.

25 Данное изобретение станет более понятным из подробного описания, приведенного ниже, и сопутствующих чертежей, которые даны только для иллюстрации и не ограничивают данное изобретение и на которых представлено следующее.

Фиг. 1а - ЭСХА-спектр образца 1, пример

1. Фиг. 1б - ЭСХА-спектр образца 2, пример

1. Фиг. 2а - пик С1, полученный методом

40 ЭСХА образца стали, помещенного в раствор ПЭИ.

Фиг. 2б - пик С1, полученный методом ЭСХА образца стали, модифицированного гиалуроновой кислотой, как описано в примере 4.

Фиг. 3а - изображение, полученное при помощи оптического микроскопа, показывающее отсутствие адгезии L-929 фибробластов к поверхности образца А, пример 6 (200x увеличение).

Фиг. 3б - изображение, полученное при помощи оптического микроскопа, показывающее адгезию L-929 фибробластов к поверхности образца В, пример 6 (200x увеличение).

Фиг. 4а - изображение, полученное при помощи оптического микроскопа, показывающее отсутствие адгезии L-929 фибробластов к поверхности образца D, пример 6 (200x увеличение).

Фиг. 4б - изображение, полученное при помощи оптического микроскопа,

C 2
C 1
C 0
C 3
C 6
C 5
C 3
C 2

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

показывающее адгезию L-929 фибробластов к поверхности образца F, пример 6 (200x увеличение).

Фиг. 5а - изображение, полученное при помощи оптического микроскопа, показывающее адгезию L-929 фибробластов к поверхности титана (200x увеличение).

Фиг. 5б - изображение, полученное при помощи оптического микроскопа, показывающее отсутствие адгезии L-929 фибробластов к поверхности титана, модифицированной эфиром гиалуроновой кислоты, как описано в примере 8 (200x увеличение).

Фиг. 6а - изображение, полученное при помощи оптического микроскопа, показывающее отсутствие адгезии L-929 фибробластов к поверхности внутрглазной линзы, модифицированной кислотой, как описано в примере 10 (50x увеличение).

Фиг. 6б - изображение, полученное при помощи оптического микроскопа, показывающее адгезию L-929 фибробластов к поверхности немодифицированной внутрглазной линзы (50x увеличение).

Фиг. 7а - изображение, полученное при помощи оптического микроскопа, показывающее отсутствие адгезии L-929 фибробластов к поверхности внутрглазной линзы, модифицированной гиалуроновой кислоты, как описано в примере 10 (200x увеличение).

Фиг. 7б - изображение, полученное при помощи оптического микроскопа, показывающее адгезию L-929 фибробластов к поверхности немодифицированной внутрглазной линзы (200x увеличение).

Подробное описание изобретения

Другие цели и области применения настоящего изобретения станут очевидны из последующего подробного описания. Однако следует иметь в виду, что подробное описание и конкретные примеры, показывающие предпочтительные формы воплощения изобретения, приведены только для иллюстрации, поскольку из данного описания будет ясно, что в объеме данного изобретения возможны различные изменения и модификации.

В общем использование данного изобретения обеспечивает покрытие предмета слоем гиалуроновой кислоты или ее производного (например, такого, как полисахарид, содержащий карбоксильные группы) или полусинтетического полимера, такого, как описанный ниже, путем образования химической связи с поверхностью субстрата. Авторы предложили два различающихся способа, которые являются преимущественными и составляют часть данного изобретения. Ниже их обозначают как "Способ А" и "Способ В", соответственно.

Как в Способе А, так и в Способе В согласно данному изобретению как альтернативу гиалуроновой кислоте или ее производным (таким как ее неполные производные (ЕР 0216453) или полисахариды, содержащие карбоксильные группы) можно использовать полусинтетические полимеры, такие как эфиры многоатомных спиртов и гиалуроновой кислоты (ЕР 0265116), внутренние эфиры кислых полисахаридов (ЕРА 0341745), эфиры карбоксиметилцеллулозы,

карбоксиметилхитин и карбоксиметиламид (ЕР 0342557), активные эфиры карбоксиполисахаридов (заявка на патент Италии N PD 94A000043), сульфированные эфиры гиалуроновой кислоты (заявка на патент Италии N PD 94000054), эфиры альгиновой кислоты (ЕР0251905), эфиры геллана (ЕРА 0518710), внутренние эфиры геллана (WO 94/03499), эфиры хитина и хитозана (ЕРА 0603264), эфиры пектовой и пектиновой кислот (УЗФ 0621877).

Способ А

Способ А согласно данному изобретению предусматривает покрытие предмета слоем гиалуроновой кислоты или ее производного или полусинтетического полимера путем образования химической связи с поверхностью субстрата. В противоположность известным и ранее описанным способам, которые включают реакцию функциональных групп макромолекулы полисахарида и функциональных групп, находящихся на поверхности, и, как было ранее указано, приводят к низким выходам, данное изобретение представляет собой способ, который может быть осуществлен в две стадии и позволяет избежать проблем, связанных с известными и описанными способами.

На первой стадии Способа А гиалуроновая кислота, ее производные или полусинтетический полимер реагируют с подходящим соединением, которое представляет собой аллоксисилановый агент сочетания, обязательно в растворе. Исключив на этой первой стадии необходимость реакции с функциональными группами, закрепленными на поверхности субстрата (и, следовательно, практически неподвижными), можно уменьшить отрицательное влияние пространственного затруднения молекулы полисахарида на первой стадии процесса.

На второй стадии Способа А продукт реакции между гиалуроновой кислотой, ее производным или полусинтетическим полимером и аллоксисилановым сочетающим агентом наносится в виде раствора на поверхность субстрата в соответствии в обычными физическими методами нанесения покрытия. Затем образуется связь между фрагментами аллоксисилана в указанном продукте реакции и субстратом во время удаления растворителя из раствора для нанесения покрытия, когда указанный раствор находится в контакте с субстратом, и вероятность протекания реакции очень высока. Опыты показывают, что эффективность Способа А неожиданно выше, когда его осуществляют в две вышеописанные стадии, по сравнению с тем, когда используют традиционные методы, описанные в уровне техники, а именно методы, включающие реакцию между функциональными группами, иммобилизованными на поверхности, и функциональными группами, имеющимися в макромолекуле полисахарида.

Соответственно в Способе А по изобретению гиалуроновая кислота, ее производное или полусинтетический полимер реагирует в водном растворе или обычно в подходящем растворителе с молекулой аллоксисиланового агента сочетания, который может присоединяться к гиалуроновой

C 2
C 3
C 5
C 6
C 3
C 5
C 6
C 3
C 2
R U 2 1 7 3

R U 2 1 7 3 5 6 3 0 2

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

кислоте, ее производному или указанному полусинтетическому полимеру одним концом и к субстрату - другим.

Как уже отмечалось, в Способе А по изобретению гиалуроновая кислота, ее производные или полусинтетический полимер реагирует с соединением, относящимся к классу аллоксисиланов. Эти соединения известны специалистам в области химии как агенты сочетания, которые могут быть использованы для улучшения адгезии между органическими или неорганическими материалами (Silane Coupling Agents, E.P. Plueddemann, Plenum Press, New York, 1982). Примерами таких аллоксисилановых агентов сочетания являются соединения, содержащие атомы галогена, такие как хлорпропилтриметоксисилан, соединения, содержащие ненасыщенные органические группы, такие как винилтриэтоксисилан и метакрилоксипропилтриметоксисилан, соединения, содержащие аминогруппы, такие как аминопропилтриметоксисилан и аминоэтиламинопропилтриметоксисилан. Однако способ по изобретению не ограничивается такими типами аллоксисилановых агентов сочетания.

В Способе А по изобретению реакция между гиалуроновой кислотой, ее производным или полусинтетическим полимером может требовать применения одной или нескольких молекул, которые позволяют протекание реакции между функциональными группами гиалуроновой кислоты, ее производного или полусинтетического полимера и функциональными группами аллоксисилана.

Этот класс соединений включает, наряду с другими, соединения, содержащие димидные группы, которые подпадают под общее определение агентов конденсации, такие как циклогексилкарбодиимид и этилдиаминопропилкарбодиимид, и такие соединения, как карбонилдимидазол и дикарбонилдимидазол, которые считаются бифункциональными агентами, известными специалистам в области синтеза протеиновых соединений. В способе по изобретению также могут быть использованы соединения, которые катализируют или способствуют реакции между функциональными группами гиалуроновой кислоты или ее производного и функциональными группами аллоксисилана. Такими примерами являются N-гидроксисукцинимид, гидроксисульфосукцинимид, 1-гидроксибензотриазола гидрат и подобные соединения, выполняющие ту же самую функцию. Использование таких соединений предусмотрено также в Способе В по изобретению, описанном ниже.

В Способе А субстрат, на который нужно нанести покрытие, адаптируют путем плазменной обработки для того, чтобы облегчить взаимодействие с продуктом реакции, содержащим гиалуроновую кислоту, ее производное или полусинтетический полимер. Не ограничиваясь какой-либо теорией, можно предположить, что обработка субстрата плазмой приводит к увеличению поверхностного натяжения субстрата таким образом, что облегчается смачиваемость раствором, содержащим гиалуроновую кислоту и аллоксисилан и другие молекулы. Более того, она позволяет ввести на

поверхность субстрата функциональные группы, способные облегчить реакцию с аллоксисиланом. В частности, это методы обработки, которые позволяют ввести гидроксильные, карбоксильные группы и в общем такие функциональные группы, которые называются кислыми в общепринятой химической терминологии. Поскольку существует много химических функциональных групп, способных облегчить взаимодействие между поверхностью субстрата и силановым агентом сочетания, условия обработки плазмой являются значительно менее строгими, чем в случае способов обработки, описанных в уровне техники. Некоторыми примерами подходящих способов обработки являются способы, использующие плазму кислорода, воздуха, азота, аргона и других редких газов, воды, спиртов и смесей указанных газов или паров. Природа субстрата не ограничена и определяется только возможностью генерирования после обработки плазмой ненужных функциональных групп, способных облегчить реакцию с силаном.

Согласно одному особенно предпочтительному варианту Способа А по изобретению реакция между гиалуроновой кислотой или ее производным и аллоксисилановым агентом сочетания происходит в водном растворе, причем гиалуроновая кислота или ее производное присутствует в количестве между 0.01 и 2%, предпочтительно между 0.1 и 1.2%. Аллоксисиланом предпочтительно является аминосилан, присутствующий в стехиометрическом количестве или в небольшом избытке. В таких предпочтительных случаях реакционный раствор предпочтительно также содержит этилдиаминопропилкарбодиимид в стехиометрическом количестве, рассчитанном согласно реакции между карбоксильными группами, имеющимися в гиалуроновой кислоте или ее производном, и аминогруппой аминосилана, или в небольшом избытке. Реакции способствует наличие N-гидроксисукцинимида в количестве между 10 и 100% в расчете на мольную концентрацию карбодиимида. Через несколько часов протекания реакции при комнатной температуре раствор наносят на поверхность предмета, который только что был обработан плазмой в соответствии с методами, обычно используемыми для нанесения тонких поверхностных слоев из раствора. Обработку предпочтительно осуществлять плазмой кислорода или воздуха с энергией заряда 1-400 Вт и предпочтительно 10-150 Вт, при давлении 10 мторр - 10 торр и временем обработки 1 с - 1 ч, предпочтительно 10 с - 30 мин. Растворитель испаряют под вакуумом или без него и при нагревании или без него. Параметры процесса на этой стадии определяются необходимостью создания условий, нужных для реакции между реакционноспособными концевыми группами аллоксисиланового агента сочетания и функциональными группами, содержащимися на поверхности субстрата после обработки плазмой. В конце любые остатки и соединения, которые не связаны, можно удалить путем промывки или подобных методов.

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

Способ В

Согласно другому варианту данного изобретения материал субстрата любого вида обрабатывают плазмой воздуха, кислорода, аргона, азота или других газов или паров, способных ввести оксигенированные функциональные группы на поверхности и/или вызвать эффект очистки и удаления органических загрязнений. Однако использование плазмы, содержащей водяной пар, как заявлено в патенте США 5409696, в способах по изобретению не требуется.

Поверхность материала, обработанная таким образом, подвергается обработке водным раствором ПЭИ (или другого поликатионного вещества, такого как полилизин и т.п.) для создания высокой поверхностной концентрации аминогрупп. Полученный материал реагирует с гиалуроновой кислотой, ее производным или полусинтетическим полимером (например, другими полисахаридами, содержащими карбоксильные группы, в присутствии агентов конденсации, таких как ЭДК, в водном растворе или дициклогексилкарбодиимиде (ДЦК) в органических растворителях). Соединение, способное ускорить реакцию, промотируемую ЭДК, также содержится. Этот класс соединений включает, но не ограничен ими, N-гидроксисукцинимид (НГС), гидроксисульфосукцинимид, гидроксизенозтриазола гидрат и подобные соединения.

Способ В согласно данному изобретению основан на удивительном наблюдении, что соединения, такие как НГС, могут способствовать реакции конденсации, промотируемой ЭДК, также в случае, когда группы связаны с поверхностью в отсутствие молекулярных структур, известных специалистам как "плечи спейсера".

В случае гиалуроновой кислоты известно, что в растворе в отсутствие НГС образуются промежуточные продукты реакции, относящиеся в общем к N-ацилмочевинам, которые препятствуют завершению реакции (X. Xu et al., *Trans IV World Biom. Cong.*, 170, 1992). Когда аминогруппы связаны с поверхностью, должны использоваться "плечи спейсера", для того чтобы придать им достаточную реактивность. "Плечо спейсера" представляет собой ряд атомов углерода, который отделяет реакционноспособную группу от поверхности, придавая ей большую свободу и увеличивая ее реакционноспособность. Например, продукт COVALINK (Nunc) представляет собой полистирол, содержащий аминогруппы, отделенные от поверхности плечом спейсера с девятью атомами углерода (K. Gregorins et al., *J. Immunol. Meth.*, 181, 65, 1995) НГС оказывается эффективным при увеличении выхода реакции, промотируемой ЭДК (J.V. Staros et al., *Anal. Biochem.*, 156, 220, 1986). Очевидно, стоимость создания сложенных молекулярных структур на поверхности, таких как функциональные группы, подкрепленные "плечами спейсера", очень высока и ограничивает процесс производства. В Способе В по изобретению аминогруппы связаны с поверхностью и находятся внутри структуры ПЭИ, использования "плеч спейсера" не требуется, как и наличия других структур. Обнаружение того факта, что НГС способен облегчать

реакцию конденсации поверхностных аминогрупп, привнесенных ЭДК, даже в отсутствие "плеча спейсера", и при этом не надо обращать особенное внимание на другие молекулярные аспекты поверхности, является удивительным и решающим фактором в Способе В по изобретению. Еще более удивительным и непредвиденным, исходя из известных знаний, является обнаружение того, что присутствие НГС в реакционной смеси оказывает решающее влияние на антиадгезионные по отношению к клеткам свойства поверхностей с нанесенным на них слоем гиалуроновой кислоты или ее производных. В действительности, когда работают в отсутствие НГС, как описано в патенте США N 5409696, невозможно придать поверхностям, покрытым гиалуроновой кислотой или ее производными, антиадгезионные свойства по отношению к клеткам, чтобы предотвратить их адгезию. С другой стороны, при использовании способов по изобретению получают поверхности, которые обладают превосходной стойкостью к заселению клетками. Хотя авторы не обязаны объяснять причины достижения результата и не намерены ограничиться какой-то одной теорией, считается, что различие можно приписать одной из следующих причин: или в отсутствие НГС выход реакции слишком низкий, и хотя гиалуроновая кислота связывается с поверхностью, это происходит в количестве, которого недостаточно для полного покрытия нежележащего материала; или связь возникает в отсутствие НГС, меняет свойства гиалуроновой кислоты, связанной с поверхностью. Полученная структура не сохраняет свойства, которые обычно ожидаются от этого вида полимера исходя из общих химических знаний.

Согласно одной особенно предпочтительной форме осуществления изобретения полимерный, металлический или керамический материал обрабатывают плазмой воздуха или кислорода с энергией заряда между 1 и 400 Вт, предпочтительно между 10 и 150 Вт, при давлении между 10 мторр и 10 торр и времени обработки между 1 с и 1 ч, предпочтительно между 10 с и 30 мин. Однако условия обработки не являются критическими и зависят от формы продукта. Обработка длится дольше, если она включает модификацию внутренней поверхности труб или других недоступных частей, в то время как плоские или наружные поверхности требуют меньшего времени.

Обработанный материал помещают в водный раствор ПЭИ с концентрацией между 0.01 и 10%, предпочтительно между 0.5 и 2%. Время реакции ограничено и составляет от 10 мин до 1 ч. В конце этой стадии материал промывают и помещают в раствор гиалуроновой кислоты или ее производного или другого полисахарида, содержащего карбоксильные группы. Концентрация полисахарида составляет 0.005-5%, предпочтительно 0.05-1%. В раствор добавляют НГС и ДНК с концентрацией 0.001-1%. Реакция протекает при комнатной температуре или при слегка повышенной температуре и может длиться от 10 мин до 48 ч. Если типы полисахарида и субстрата являются подходящими, реакция может протекать в органическом растворителе с использованием ДНК и НГС, введенных в

R U
2 1 7 3 5 6 3
C 2

C 2
3 5 6 3
2 1 7 3

ранее указанных концентрациях.

Значение данного изобретения (Способы А и В) будет очевидным любому специалисту в данной области. В действительности, способом согласно данному изобретению можно получить предметы с благоприятными поверхностными свойствами благодаря наличию гиалуроновой кислоты или ее производного, причем эти свойства остаются стабильными во времени, что обусловлено химическими связями между покрытием и субстратом. Более того, поверхности таких предметов обладают антиадгезионными свойствами по отношению к клеткам и бактериям, присутствующим в биологических жидкостях. Ниже приводится несколько иллюстративных предметов, и любые изменения, очевидные для специалиста в данной области, входят в объем данного изобретения.

Пример 1

Образец полистирола отбирают из бактериологической чашки Петри (Corning) и обрабатывают плазмой в реакторе с параллельными пластинами (Gambetti Kenologia). Обработку проводят при давлении кислорода 100 мторр, энергии заряда 50 Вт, скорости потока 20 см³/мин и времени обработки 30 с. Обработанные образцы погружают на 2 ч в 0.5%-ный раствор ПЭИ (Aldrich) в воде. Затем они вынимаются, промываются водой и погружаются в пробирки для проведения испытаний, содержащие 5 мл следующих растворов:

1) 1% (веса) гиалуроновой кислоты (Fidia Advanced Biopolymers, Brindisi);

2) 1% (веса) гиалуроновой кислоты, 0.02 г 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимида (Sigma), 0.02 г N-гидроксисукцинидима (Sigma);

3) 1% (веса) гиалуроновой кислоты, этерифицированной на 25% бензиловым спиртом (Fidia Advanced Biopolymers, Brindisi);

4) 1% (веса) гиалуроновой кислоты, этерифицированной на 25% бензиловым спиртом (Fidia Advanced Biopolymers, Brindisi), 0.02 г 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимида (Sigma), 0.3 г N-гидроксисукцинидима (Sigma);

5) 1% (веса) гиалуроновой кислоты, этерифицированной на 50% бензиловым спиртом (Fidia Advanced Biopolymers, Brindisi);

6) 1% (веса) гиалуроновой кислоты, этерифицированной на 50% бензиловым спиртом, 0.02 г 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимида (Sigma), 0.02 г N- гидроксисукцинидима (Sigma).

Образцы оставляют в пробирках при комнатной температуре на 12 ч, после чего они в течение ночи промываются водой. Эффективность обработки определяют методом ЭСХА (электронной спектроскопии для химического анализа). Как уже известно (Garbassi F. et al. Polymer Surfaces, from Physics to Technology, Wiley, Chichester, 3, 1994), этим методом можно установить химический состав поверхности материалов. Анализ осуществляют на Perkin Elmer PHI 5500 ESCA System. Помимо вышеописанных образцов используют образец, обработанный плазмой и помещенный только в ПЭИ (табл. 1).

Данные табл. 1 показывают значительное увеличение кислорода, находящегося на

поверхности, после процесса модификации, как это ожидалось после введения гиалуроновой кислоты или ее эфиров. С другой стороны, в отсутствие ЭДК и НГС состав поверхности остается подобным.

Более того, детальный анализ пика С1 показывает большое количество СО связей в соответствии с ожидаемой молекулярной структурой. Спектры ЭСХА образцов 1 и 2 показаны на фиг. 1а и 1б.

Пример 2

Другие образцы, приготовленные в соответствии со способом, описанным в примере 1, погружают в воду, оставляя на 2 мес. Проводят ЭСХА. Никаких уменьшений или изменений в поверхностях концентрации кислорода не наблюдается, что подтверждает стабильность связи между полисахаридом и поверхностью.

Пример 3

Пленка полистиlena, используемая для упаковки, обрабатывается плазмой и погружается в ПЭИ, как описано в Примере 1. Приготавливают два образца и погружают в следующие растворы в диметилсульфоксиде (Fluka):

1) 1% гиалуроновой кислоты, этерифицированной на 75% бензиновым спиртом (Fidia Advanced Biopolymers, Brindisi);

2) 1% гиалуроновой кислоты, этерифицированной на 75% бензиновым спиртом, 0.02 г 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимида, 0.02 г N-гидроксисукцинидима.

После промывки в течение 24 ч в диметилсульфоксиде образцы анализируют методом ЭСХА. Получают следующие результаты (табл. 2).

Пример 4

Образец стали 316, обычно используемый для биомедицинских целей, обрабатывают плазмой воздуха в течение 15 мин, затем помещают в соприкосновение с раствором 0.5% ПЭИ в течение 2 ч. Используя раствор 2, описанный в примере 1, связывают с поверхностью материала гиалуроновую кислоту. Затем материал анализируют методом ЭСХА. Полученный пик С1 показан на фиг. 2: фиг. 2а относится к образцу после выдержки в растворе ПЭИ, фиг. 2б относится к пику С1 образца, который подвергается полной модификации. В последнем случае можно видеть типичную широкую многокомпонентную форму, характерную для пика С1 полисахаридов (см., например, ранее указанную статью E. Ostberg et al., Journal of Biomedical Materials Research, 29, 741, 1995), что подтверждает наличие гиалуроновой кислоты на поверхности.

Пример 5

Чашки Петри для клеточной культуры (Corning) модифицируют, как описано в примере 1 (3 чашки на обработку). В приготовленные таким образом чашки помещают 5 мл клеточной суспензии (клетки фибробласта соединительной ткани мыши, L-929 в среде Minimum Essential Eagle's, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, антибиотики, пенициллин, стрептомицин и амфотерицин В и L-глютамин-SPA, Milan), затем помещают их в инкубатор (Forma) при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ при 98%-ной влажности. Взаимодействие клетка-клетка и полистирольной основы анализируют через

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

регулярные интервалы при помощи оптического контрастнофазового микроскопа (Leica). В частности, оценивается, способны ли клетки прилипать к подложкам, обработанным различными методами, и до какой степени, с использованием в качестве контрольного образца чашки Петри, обработанной только плазмой, обладающей максимальной адгезией. В этом примере (исходя из средней величины, полученной в течение 24 ч) величина 5 относится к максимальной адгезии, а величина 0 означает отсутствие адгезии.

Образец - Балл

Контрольный - 5
1 - 4
2 - 0
3 - 4
4 - 0
5 - 4
6 - 0

Опыт подтверждает наличие гидрофильного слоя, прочно связанного и способного предотвратить адгезию клеток.

Пример 6

Четыре полистирольных чашки Петри обрабатывают способом, описанным в примере 1, используя раствор 2 гиалуроновой кислоты (эти образцы обозначены буквой А). Такое же число чашек обрабатывают в соответствии со способом нанесения гиалуроновой кислоты, описанным в примере 11 патента США 5409696 (эти образцы обозначены буквой В). Модифицированные чашки приводят в контакт с супензией клеток L-929, как описано в предыдущем примере. Адгезия клеток оценивается, как в предыдущем примере, получены следующие результаты:

Образец - Балл
Контрольный - 5
A - 0
B - 4

На фиг. 3а и 3б приведены изображения, полученные при помощи оптического микроскопа и показывают состояние поверхности в конце опыта. Фиг. 3а относится к образцу А, фиг. 3б - к образцу В. Четко видна разница в стойкости к адгезии клеток.

Пример 7

Четыре полистирольных чашки Петри обрабатывают в соответствии со способом, описанным в примере 1, используя растворы 4 и 6 эфиров гиалуроновой кислоты (Эти образцы обозначены С и D соответственно). Такое же число чашек обрабатывают в соответствии со способом нанесения гиалуроновой кислоты, описанным в патенте США 5409696, используя те же эфиры гиалуроновой кислоты (эти образцы обозначены Е и F). Модифицированные чашки приводят в контакт с супензией клеток L-929, как описано в предыдущем примере. Адгезия клеток оценивается, как в предыдущем примере, получают следующие результаты:

Образец - Балл
Контроль - 5
C - 0
D - 0
E - 5
F - 5

На фиг. 4а и 4б показаны изображения, полученные при помощи оптического микроскопа, и показано состояние

поверхностей в конце опыта: Фиг. 4а относится к образцу D, фиг. 4б - к образцу F. Четко видна разница в степени стойкости клеток при осуществлении двух способов.

Пример 8

Небольшой лист титана (Aldrich) модифицируют плазмой и обрабатывают ПЭИ, как описано в примере 4. Обработанная таким образом поверхность реагирует с раствором 6, как в примере 1. Четыре образца немодифицированного титана и четыре образца титана, которые подверглись процессу модификации, приводят в контакт с супензией клеток L-929, как в предыдущем примере. Адгезия клеток оценивается через 24 ч путем окрашивания клеток толуидиновым голубым и наблюдения за культивированными образцами в металлографический микроскоп. Результаты этих наблюдений представлены на фиг. 5а и фиг 5б. Фиг. 5а относится к образцу, не модифицированному эфиром гиалуроновой кислоты в соответствии с данным способом. Очевидно, что на этих двух поверхностях клетки ведут себя по-разному. В случае модифицированного материала клетки сохраняют круглую форму и не приобретают сплющенный вид, типичный для клеток, которые прочно соединялись с субстратом, как это имеет место в случае немодифицированного материала (фиг. 5а).

Пример 9

Процесс модификации, описанный в примере 8, осуществляют на стеклянном слайде. Модифицированное стекло, образец немодифицированного стекла и полистирольная чашка, модифицированная плазмой (используемая как контрольный образец из-за максимальной адгезии), приводятся в контакт с клетками L-929. Адгезия клеток оценивают через 24 ч. Получены следующие результаты:

Образец - Балл

Контрольный - 5
Обычное стекло - 5
Модифицированное стекло - 0

Пример 10

Процесс модификации, описанный в примере 1, осуществляют на двух глазных линиях (*Sanitaria Scaligera*), используя раствор 0.5% офтальмологической гиалуроновой кислоты (Fidia Advanced Biopolymers), 0.4% ЭДК и 0.4% НГС. Модифицированные линзы и такое же количество немодифицированных линз помещают в чашки Петри, и затем приводят в контакт с супензией клеток L-929, как в предыдущих примерах. Стойкость образцов к адгезии клеток показана на фиг. 6 и 7. Это фотографии поверхностей линз, модифицированных согласно данному способу (6а и 7а), и немодифицированных (6б и 7б). Здесь ясно показана различная способность двух поверхностей ингибировать адгезию клеток.

Пример 11

Образец полистирола отбирают из бактериологической чашки Петри (Corning) и обрабатывают плазмой в реакторе с параллельными пластинами (Gambetti Kepolognia). Обработку проводили при давлении кислорода 100 мторр, энергии заряда 100 Вт, скорости потока 20 см³ (См)/мин и времени обработки 1 мин. Обработанные образцы погружают и вынимают пять раз из следующих водных

R
U
2
1
7
3
5
6
3

C
2

R
U
2
1
7
3
5
6
3

C
2

растворов, приготовленных за 6 ч до этого, и оставляют при комнатной температуре:

- 1) 1% гиалуроновой кислоты (Fidia Advanced Biopolymers);
- 2) 1% (вес.) гиалуроновой кислоты, 0.4 г 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбомида (Sigma), 1% (об.) 3-аминопропилтритметоксисилана (Sigma);
- 3) 1% (вес.) гиалуроновой кислоты, этерифицированной на 25% бензоловым спиртом (Fidia Advanced Biopolymers), 0.35 г 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбомида (Sigma), 0.3 г N-гидроксисукциниамида (Sigma), 1% (об.) 3-аминопропилтритметоксисилан (Sigma);
- 4) 1% (вес.) гиалуроновой кислоты, на 50% этерифицированной бензиловым спиртом (Fidia Advanced Biopolymers), 0.35 г 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (Signal), 0.3 г N-гидроксисукциниамида (Signal), 1% (об.) 3-аминопропилтритметоксисилана (Sigma).

Образцы сушат в печке при 60°C в течение ночи и затем промывают в воде и сушат сжатым воздухом. Для проверки целостности покрытия образцы погружают в 1%-ный раствор толуидинового голубого в воде (Aldrich). Это немедленно вызывает окраску гиалуроновой кислоты и других полисахаридов в яркий фиолетово-голубоватый цвет. Эффективность процесса оценивают по пятибалльной шкале от 0 до 5, при этом 5 соответствует абсолютно ровной окраске (свидетельствуя о целостности покрытия гиалуроновой кислоты или ее производного) и 0 используют в отсутствие окраски. Образцы, приготовленные в соответствии с описанным примером (номера соответствует номеру раствора, в который погружали образец), характеризуются следующими показателями:

Образец - Балл
1 - 1
2 - 5
3 - 5
4 - 5

Примечание: окраска вначале кажется однородной, но окрашенное покрытие после выдержки в воде в течение нескольких секунд разрушается.

Пример 12

Несколько образцов готовят согласно методу, описанному в Примере 11. Образцы погружают в воду при комнатной температуре на 20 дней, после чего проводят испытание окрашиванием. Получают следующие результаты:

Образец - Балл
1 - 0
2 - 5
3 - 5
4 - 4

Пример 13

Следующий пример позволяет оценить эффективность описанного способа, а именно взаимодействие между полисахаридом и функциональными группами в растворе в отличие от обычного способа, включающего реакцию между группами, зафиксированными на поверхности, и группами, имеющимися в полисахариде. Разрезают силиконовый катетер на образцы длиной 3 см. Ряд образцов обрабатывают согласно способу, описанному в примере 11, растворами 2, 3 и 4. Вторую серию образцов обрабатывают

пластмассой и наносят 3-аминопропилтритметоксисилан (Sigma) из 1% (об.) водного раствора. После сушки образцы приводят в контакт со следующими растворами:

- 2a) 1% (вес.) гиалуроновой кислоты, 0.4 г 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида (Sigma), 0.3 г N-гидроксисукциниамида (Sigma);

3a) 1% (вес.) гиалуроновой кислоты, этерифицированной на 25% бензиловым спиртом (Fidia Advanced Biopolymers), 0.351 г 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (Sigma);

- 4a) 1% (вес.) гиалуроновой кислоты, этерифицированной на 25% бензиловым спиртом (Fidia Advanced Biopolymers), 0.35 г 1-этап-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (Sigma), 0.3 г N-гидроксисукциниамида (Sigma).

Образцы сушат при 60°C в печке в течение ночи и затем промывают водой и сушат сжатым воздухом. При окрашивании получают следующее:

Образец - Балл
2 - 5
3 - 5
4 - 5
2a - 1
3a - 0
4a - 0

Пример 14

Бактериологические полистирольные чашки Петри (Corning) обрабатывают, как описано в примере 11 (3 чашки на обработку), используя растворы 1, 2 и 3. Полученные таким образом чашки заполняют 5 мл клеточной супензии (клетки фибробласта соединительной ткани мыши, L-929 в Minimum Eagle's Medium, к которой добавлены 10% фетальной телячьей сыворотки, антибиотики, пенициллин, стрептомицин и амфотерицин B и L-глютамин-SPA), помещают в инкубатор (Forma) при 37°C в среду, содержащую 5% CO₂, при 98%-ной влажности.

Взаимодействия клетка-клетка и полистирольной подложки, обработанной как описано в примере 11, оценивают через регулярные интервалы при помощи оптического микроскопа с контрастными фазами (Leica), в частности, оценивая, прилипают ли клетки к подложкам, обработанным разными способами, и в какой степени, используя в качестве контрольного образца чашку Петри, обработанную только пластмассой и характеризующуюся максимальной адгезией. В этом примере (на основе среднего значения величин, полученных в результате наблюдений, проводимых в течение 24 ч) балл 5 относится к максимальной адгезии, а балл 0 означает отсутствие адгезии:

Образец - Балл
Контрольный - 5
1 - 3
2 - 0
3 - 0

Экспрессия подтверждают наличие слоя, прочно связанного с подложкой и способного предотвратить адгезию клеток. Этот гидрофильный слой удаляется с поверхности образца, обработанного раствором 1, который не позволяет достичь образования

R U ? 1 7 3 5 6 3 C 2

химической связи.

Пример 15

Силиконовый катетер (Silikomed) разрезают на части, каждая длиной 7 см. Четыре образца обрабатывают в условиях, описанных в примере 11, растворами 1, 2, 3 и 4. Скольжение катетеров в водной среде оценивается следующим методом: пробирку для испытаний заполняют Agar (Sigma) с концентрацией 0.7%. Пробирку укрепляют в горизонтальном положении и внутрь помещают отрезок катетера длиной 7 см, причем один конец катетера слегка выступает из Agar. К этому концу прикладывают нагрузку при помощи нити, которую затем наматывают на колесо так, что под действием нагрузки катетер вынимается из Agar, в который он погружен. Благодаря характерным свойствам Agar можно оценить скольжение катетера в водной среде. Время, необходимое для извлечения катетера из Agar, обратно пропорционально величине скольжения катетера. В этом опыте получены следующие результаты:

Образец - Время экстракции (с)

- 1 - 90 ± 13
- 2 - 35 ± 6
- 3 - 38 ± 8
- 4 - 36 ± 9

Обработанный только плазмой - 125 ± 15

Необработанный - 120 ± 10

Пример 16

Следующий пример верифицирует метод использования плазмы для поверхности разного состава, этот метод оказывается эффективным также для материалов с различным химическим составом. Более того, пример показывает, что метод является эффективным также в случаях, когда предмет, на которой должно быть нанесено покрытие, изготовлен из нескольких разных материалов.

В качестве образцов готовят отрезки катетера длиной 3 см. Они изготовлены из: а) силикона; б) полиуретана; в) поливинилхлорида; г) каучукового латекса. Для наблюдения используется стеклянная крышка. Образцы обрабатывают плазмой, как описано в примере 1 и затем обрабатывают раствором 2, указанным в этом примере. Метод окрашивания дает следующие результаты:

Материал - Балл

- Силикон - 5
- Полиуретан - 5
- Поливинилхлорид - 5
- Латекс - 5
- Стекло - 5

Пример 17

1%-ный раствор гиалуроновой кислоты, этирифицированной на 75% бензиловым спиртом (Fidia Advanced Biopolymers) приготавливают в среде диметилсульфоксида (Aldrich). Аликвот раствора отбирают и добавляют к нему 1.1 об.% аминоэтиламинопропилtrimетоксисилана и 0.5 г дациклогексилкарбодимида (Aldrich). Через 6 ч два ранее описанных образца катетера обрабатывают плазмой, как описано в примере 14. Один из образцов погружают в раствор эфира, другой - в раствор эфира и силана и медленно вынимают. Образцы помещают в вакуумную печь при 60°C и 100 торр и оставляют там на 48 ч. Опыт с окрашиванием дает следующие результаты:

Образец - Балл

Раствор эфира - 1

Раствор эфира и аминоксилана - 4

Только плазма - 0

Необработанный - 0

Пример 18

Готовят 1%-ный раствор гиалуроновой кислоты, этирифицированный на 50% этиловым спиртом (Fidia Advanced Biopolymers) в диметилсульфоксида (Aldrich). Отбирают аликвоты этого раствора и к нему добавляют 1 об.% аминоэтиламинопропилметоксисилана и 0.5 г дациклогексилкарбодимида (Aldrich). Через 6 ч два образца вышеописанного катетера обрабатывают плазмой согласно условиям, описанным в примере 14. Один из образцов погружают в раствор эфира, другой - в раствор эфира и аминоксилана и медленно их вынимают. Образец помещают в вакуумную печь при 60°C и 100 торр и оставляют там на 48 ч. Опыт с окрашиванием дает следующий день следующие результаты:

Образец - Балл

Раствор эфира - 1

Раствор эфира и аминоксилана - 5

Только плазма - 0

Необработанный - 0

Пример 19

Готовят 1%-ный раствор гиалуроновой кислоты, этирифицированной на 100% бензиловым спиртом (Fidia Advanced Biopolymers), в диметилсульфоксида (Aldrich). Отбирают аликвоты этого раствора и к нему добавляют 1 об.% аминоэтиламинопропилtrimетоксисилана и 0.5 г карбонилдиimidазола (Aldrich). Через 6 ч два образца ранее описанного катетера обрабатывают плазмой согласно условиям примера 14. Один из образцов погружают в раствор эфира, а другой - в раствор аминоксилана и медленно их вынимают. Образцы помещают в вакуумную печь при 60°C и 100 торр и оставляют там на 48 ч. Опыт с окрашиванием дает следующие результаты:

Образец - Балл

Раствор эфира - 1

Раствор эфира и аминоксилана - 4

Только плазма - 0

Необработанный - 0

Пример 20

Готовят 1%-ный раствор гиалуроновой кислоты, этирифицированной этиловым спиртом (Fidia Advanced Biopolymers), в диметилсульфоксида (Aldrich). Отбирают аликвоты этого раствора и добавляют к нему 1 об.% аминоэтиламинопропилtrimетоксисилана и 0.5 г карбонилдиimidазола (Aldrich). Через 6 ч два образца ранее описанного катетера обрабатывают плазмой согласно условиям примера 14. Один из образцов погружают в раствор эфира, а другой - в раствор эфира и аминоксилана и медленно их вынимают. Образцы помещают в вакуумную печь при 60°C и 100 торр и оставляют там на 48 ч. Опыт с окрашиванием дает следующие результаты:

Образец - Балл

Раствор эфира - 1

Раствор эфира и аминоксилана - 4

Только плазма - 0

Необработанный - 0

Пример 21

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

Готовят 1%-ный раствор сшитой гиалуроновой кислоты (10% карбоксильных групп, введенных в процессе внутренней этерификации, - 90% карбоксильных групп, образовавших натриевые соли), в диметилсульфоксиде (Aldrich). Отбирают аликвот этого раствора и добавляют к нему 1 об.% аминоэтиламинопропилтриметоксисилана и 0.5 г дициклогексилкарбодимида (Aldrich). Через 6 ч два образца ранее описанного катетера обрабатывают плазмой согласно условиям, описанным в примере 4. Один из образцов погружают в раствор эфира, другой - в раствор эфира и аминоксилана и медленно их вынимают. Образцы помещают в вакуумную печь при 60°C и 100 торр и оставляют там на 48 ч. Опыт с окрашиванием дает следующие результаты:

Образец - Балл

Раствор эфира - 1

Раствор эфира и аминоксилана - 5

Только плазма - 0

Необработанный - 0

Пример 22

Готовят 1%-ный раствор альгиновой кислоты (50% карбоксильных групп этерифицированных групп, бензиловым спиртом, и 50% карбоксильных групп, образовавших соли) в диметилсульфоксиде (Aldrich). Отбирают аликвот этого раствора и добавляют 1 об.% аминоэтиламинопропилтриметоксисилана и 0.5 г дициклогексилкарбодимида (Aldrich). Через 6 ч два образца ранее описанного катетера обрабатывают плазмой согласно условиям примера 14. Один из образцов погружают в раствор эфира, другой - в раствор эфира и аминоксилана и медленно их вынимают. Образцы помещают в вакуумную печь при 60°C и 100 торр и оставляют там на 48 ч. Опыт с окрашиванием дает следующие результаты:

Образец - Балл

Раствор эфира - 1

Раствор эфира и аминоксилана - 4

Только плазма - 0

Необработанный - 0

Следовательно, цель данного изобретения состоит в создании новых и усовершенствованных способов получения предметов, покрытых тонким слоем гиалуроновой кислоты или ее производных или других полусинтетических полимеров, химически связанных с субстратом. Эти способы могут быть применены для производства материалов и изделий с гидрофильными поверхностями. Более конкретно, способ может быть использован при приготовлении материалов для биомедицинских и хирургических целей, в урологии, ортопедии, оториноларингологии, гастроэнтерологии, офтальмологии, при лечении сердечно-сосудистых заболеваний и в диагностических целях, приспособлений для внешнего и внутреннего использования, таких как катетеры, приемники для крови, направляющие капилляры, зонды, шприцы, хирургические инструменты, зонды, шприцы, хирургические инструменты, контейнеры, фильтрационные системы, при изготовлении протезов или для хирургических целей или имплантантов. Можно наносить покрытие на искусственные сухожилия, суставы, штифты, сердечные клапаны, заменители костей и

сосудов, трансплантаты, венозные катетеры, глазные линзы, заменители мягких тканей, и т.д. Примерами приспособлений, на которые можно наносить покрытия, являются контактные линзы. Можно также наносить покрытия на сложные приспособления, симулирующие физиологические процессы, такие как искусственные почки, оксигенаторы крови, искусственные сердце, поджелудочная железа и печень. Наконец, в области диагностирования покрытия можно наносить на лабораторное оборудование, чаши для клеточных или тканевых культур и/или регенерации и на подложки для активных веществ, таких как пептиды, пружины или антитела.

Формула изобретения:

1. Способ нанесения на поверхность предмета покрытия на основе гиалуроновой кислоты или ее производного, включающий взаимодействие гиалуроновой кислоты или ее производного с алcoxисилановым агентом сочетания в водной среде или в органическом растворителе в присутствии конденсирующего или бифункционального агента с получением раствора, содержащего продукт реакции гиалуроновой кислоты или ее производного и алcoxисиланового агента сочетания, обработку поверхности предмета плазмой, нанесение на обработанную поверхность указанного раствора, содержащего продукт реакции гиалуроновой кислоты или ее производного и алcoxисиланового агента сочетания, удаление раствора с поверхности указанного предмета, тогда как указанный продукт реакции гиалуроновой кислоты или ее производного и алcoxисиланового агента сочетания реагирует с указанной поверхностью предмета.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что алcoxисилановый агент сочетания содержит сульфидильные группы или аминогруппы.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что алcoxисилановый агент сочетания представляет собой гамма-аминопропилтриэтоксисилан или N-бета(аминоэтил)-гамма-аминопропилтриметоксисилан.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что реакция между алcoxисилановым агентом сочетания и гиалуроновой кислотой или ее производным протекает в водной среде в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимида в качестве указанного конденсирующего агента или в органическом растворителе в присутствии дициклогексилкарбодимида в качестве указанного конденсирующего агента.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что реакция между алcoxисилановым агентом сочетания и гиалуроновой кислотой или ее производным протекает в присутствии дополнительно введенного N-гидроксисукциниамида,

гидроксисульфосукциниамида, гидроксисульфосукциниамида, гидроксибензоизолигидрата или подобного соединения, которое катализирует реакцию между карбоксильными группами гиалуроновой кислоты и алcoxисилановым агентом сочетания или способствует ей.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная плазма представляет собой плазму кислорода, плазму крови, плазму воды,

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

R
U
2
1
7
3
5
6
3
C
2

C 2
2 1 7 3 5 6 3 C 2

плазму спирта, плазму ацетона, плазму оксигенированного соединения, плазму азота, плазму аргона или смесь двух или нескольких плазм.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что производные гиалуроновой кислоты представляют собой полный или частичный бензиловый эфир гиалуроновой кислоты или полный или частичный этиловый эфир гиалуроновой кислоты.

8. Способ по п.1, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выполнен из материала, который является совместимым с физиологическими жидкостями.

9. Способ по п.1, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выбран из группы, включающей катетеры, приемники для крови, направляющие капилляры, зонды, шприцы, хирургические инструменты, контейнеры, фильтрационные системы, искусственные сухожилия, суставы, штифты, сердечные клапаны, заменители костей и сосудов, трансплантаты, венозные катетеры, внутриглазные линзы, контактные линзы, заменители мягких тканей, искусственные почки, оксигенаторы крови, искусственные сердце, поджелудочная железа и печень.

10. Способ по п.1, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выбран из группы, включающей предметы лабораторного оборудования, чашки для регенерации клеток и тканей и носители для активных веществ, являющихся пептидами, протеинами и антителами.

11. Способ нанесения на поверхность предмета покрытия на основе полусинтетического полимера, включающий взаимодействие полусинтетического полимера с аллоксисилановым агентом сочетания в водной среде или в среде органического растворителя в присутствии конденсирующего или бифункционального агента с получением раствора, содержащего продукт реакции полусинтетического полимера и аллоксисиланового агента сочетания, обработку поверхности предмета плазмой, нанесение на обработанную поверхность указанного предмета раствора, содержащего продукт реакции полусинтетического полимера и аллоксисиланового агента сочетания, удаление раствора с поверхности указанного предмета, тогда как указанный продукт реакции полусинтетического полимера и аллоксисиланового агента сочетания реагирует с указанной поверхностью предмета.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что указанная плазма представляет собой плазму кислорода, плазму крови, плазму воды, плазму спирта, плазму ацетона, плазму оксигенированного соединения, плазму азота, плазму аргона или смесь двух или нескольких плазм.

13. Способ по п. 11, отличающийся тем, что реакция между полусинтетическим полимером и аллоксисилановым агентом сочетания протекает в водной среде в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида в качестве указанного конденсирующего агента или в среде органического растворителя в присутствии

дициклогексилкарбодиимида в качестве указанного конденсирующего агента.

14. Способ по п. 11, отличающийся тем, что реакция между полусинтетическим полимером и аллоксисилановым агентом сочетания протекает в присутствии дополнительно введенного N-гидроксисукцинамида, гидроксисульфосукцинамида, гидроксибензоатриазолгидрата или подобного соединения, которое катализирует реакцию между функциональными группами полусинтетического полимера и аллоксисиланового агента сочетания или способствует ей.

15. Способ по п.11, отличающийся тем, что полусинтетический полимер выбран из группы, состоящей из эфира многоатомного спирта и гиалуроновой кислоты, внутреннего эфира кислого полисахарида, эфира карбоксиметилцеллюлозы, эфира карбоксиметилхитина, эфира карбоксиметиламида, активного эфира карбоксиподдерживающего полисахарида, сульфированного эфира гиалуроновой кислоты, эфира альгиновой кислоты, эфира хитина, эфира хитозана, эфира пектовой и эфира пектиновой кислот.

16. Способ по п.11, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выполнен из материала, который является совместимым с физиологическими жидкостями.

17. Способ по п.11, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выбран из группы, включающей катетеры, приемники для крови, направляющие капилляры, зонды, шприцы, хирургические инструменты, контейнеры, фильтрационные системы, искусственные сухожилия, суставы, штифты, сердечные клапаны, заменители костей и сосудов, трансплантаты, венозные катетеры, внутриглазные линзы, контактные линзы, заменители мягких тканей, искусственные почки, оксигенаторы крови, искусственные сердце, поджелудочная железа и печень.

18. Способ по п.11, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выбран из группы, включающей предметы лабораторного оборудования, чашки для регенерации клеток и тканей и носители для активных веществ, являющихся пептидами, протеинами и антителами.

19. Способ нанесения на поверхность предмета покрытия на основе гиалуроновой кислоты или ее производного, включающий обработку поверхности предмета плазмой, погружение обработанной поверхности предмета в раствор, содержащий полистиленмин с получением поверхности, содержащей аминогруппы, взаимодействие погруженной обработанной поверхности предмета с гиалуроновой кислотой или ее производными в присутствии карбодиимида или по меньшей мере одного вещества, выбранного из группы, содержащей N-гидроксисукцинимид,

гидроксисульфосукцинимид, гидроксибензоатриазолгидрат и им подобных, которые катализируют реакцию между карбоксильными группами гиалуроновой кислоты или ее производного и аминогруппами поверхности.

20. Способ по п.19, отличающийся тем, что

R
U
2
1
7
3
5
6
3

C
O
2

C
2
3
5
6
3
C
2

R
U

производные гиалуроновой кислоты представляют собой полный или частичный бензиловый эфир гиалуроновой кислоты или полный или частичный этиловый эфир гиалуроновой кислоты.

21. Способ по п. 19, отличающийся тем, что реакция между обработанной поверхностью и гиалуроновой кислотой или ее производным осуществляется в водном растворе в присутствии N-гидроксисукциниимида и 1-этил-3-(3-диметиламинопропилкарбодиимида) или в органическом растворителе в присутствии N-гидроксисукциниимида и дициклогексилкарбодиимида.

22. Способ по п.19, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выполнен из материала, который является совместимым с физиологическими жидкостями.

23. Способ по п.19, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выполнен из полимерного материала, керамического материала или металла.

24. Способ по п.19, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выполнен из металла, выбранного из группы, включающей титан, сплав титана, сталь и сплав хрома с кобальтом.

25. Способ по п.19, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выбран из группы, включающей катетеры, приемники для крови, направляющие капилляры, зонды, шприцы, хирургические инструменты, контейнеры, фильтрационные системы, искусственные сухожилия, суставы, штифты, сердечные клапаны, заменители костей и сосудов, трансплантаты, венозные катетеры, внутриглазные линзы, контактные линзы, заменители мягких тканей, искусственные почки, оксигенаторы крови, искусственные сердце, поджелудочная железа и печень.

26. Способ по п.19, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выбран из группы, включающей предметы лабораторного оборудования, чашки для регенерации клеток и тканей и носители для активных веществ, являющихся пептидами, протеинами и антителами.

27. Способ нанесения на поверхность предметов покрытия на основе полусинтетического полимера, включающий обработку поверхности предмета плазмой, погружение обработанной поверхности предмета в раствор, содержащий полиэтиленимин, взаимодействие погруженной отработанной поверхности предмета с полусинтетическим полимером в присутствии карбодиимида и по меньшей мере одного вещества, выбранного из группы, состоящей из N-гидроксисукциниимида, гидроксисульфосукциниимида, гидроксибензотриазолгидрата и им подобных,

способных усилить реакцию, которая промотируется карбонатом кальция и ацетатом кальция, этилендиметиламинопропилкарбодиимиом.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что полусинтетический полимер выбран из группы, состоящей из эфира многоатомного спирта и гиалуроновой кислоты, внутреннего эфира кислого полисахарида, эфира карбоксиметилцеллюлозы, эфира карбоксиметилхитина, эфира

10 карбоксиметиламида, активного эфира карбоксилсодержащего полисахарида, сульфированного эфира гиалуроновой кислоты, эфира альгиновой кислоты, эфира хитина, эфира хитозана, эфира пектовой и эфира пектиновой кислот.

15 29. Способ по п. 27, отличающийся тем, что реакцию между отработанной поверхностью и полусинтетическим полимером проводят в водном растворе в присутствии N-гидроксисукциниимида и 1-этил-3-(3-диметиламинопропилкарбодиимида) или в водном растворе в присутствии N-гидроксисукциниимида и дициклогексилкарбодиимида.

30 30. Способ по п.27, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выполнен из материала, который является совместимым с физиологическими жидкостями.

35 31. Способ по п.27, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выполнен из полимерного материала, керамического материала или металла.

40 32. Способ по п.27, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выполнен из металла, выбранного из группы, включающей титан, сплав титана, сталь и сплав хрома с кобальтом.

45 33. Способ по п.27, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выбран из группы, включающей катетеры, приемники для крови, направляющие капилляры, зонды, шприцы, хирургические инструменты, контейнеры, фильтрационные системы, искусственные сухожилия, суставы, штифты, сердечные клапаны, заменители костей и сосудов, трансплантаты, венозные катетеры, внутриглазные линзы, контактные линзы, заменители мягких тканей, искусственные почки, оксигенаторы крови, искусственные сердце, поджелудочная железа и печень.

50 34. Способ по п.27, отличающийся тем, что предмет, на который наносится покрытие, выбран из группы, включающей предметы лабораторного оборудования, чашки для регенерации клеток и тканей и носители для активных веществ, являющихся пептидами, протеинами и антителами.

55 Приоритет по признакам:
07.02.1995 - по пп.1 - 18;
20.12.1995 - по пп.19 - 34.

Таблица 1

Атомарный состав поверхности, %

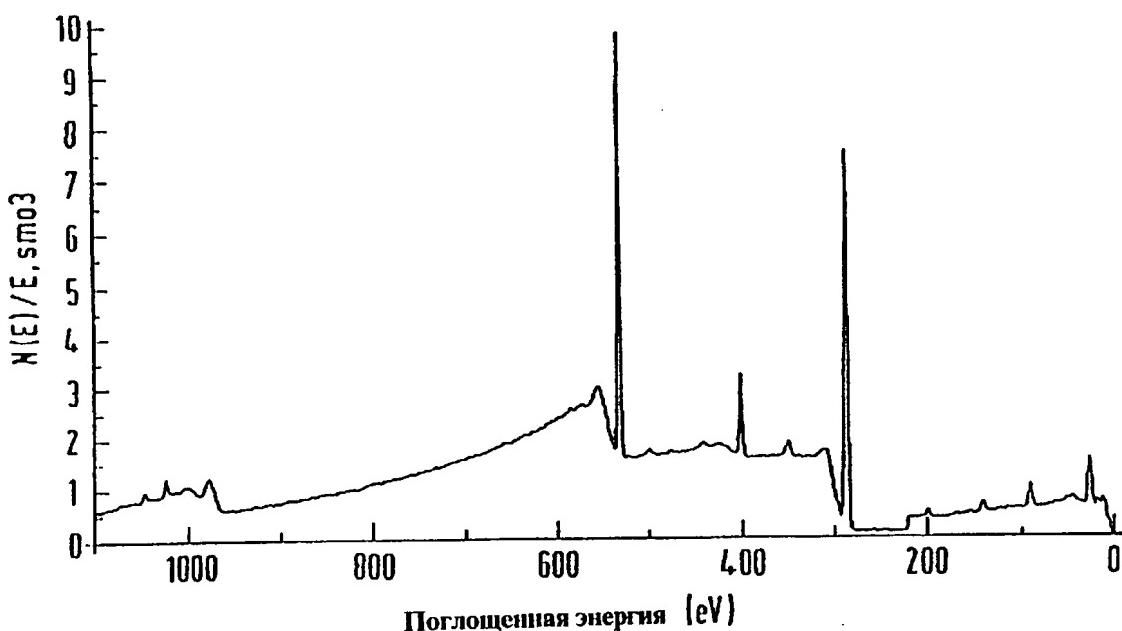
| Образец | O | C | N |
|------------|------|------|-----|
| 1 | 11.8 | 79.3 | 7.1 |
| 2 | 26.4 | 65.5 | 7.1 |
| 3 | 11.5 | 78.9 | 7.6 |
| 4 | 23.2 | 67.4 | 6.0 |
| 5 | 11.8 | 79.0 | 7.3 |
| 6 | 21.6 | 69.0 | 6.8 |
| только ПЭИ | 11.2 | 78.8 | 7.5 |

Таблица 2

Атомарный состав, %

| Образец | O | C | N |
|------------|------|------|-----|
| 1 | 11.8 | 79.3 | 7.1 |
| 2 | 21.4 | 65.5 | 6.4 |
| только ПЭИ | 11.2 | 78.8 | 7.5 |

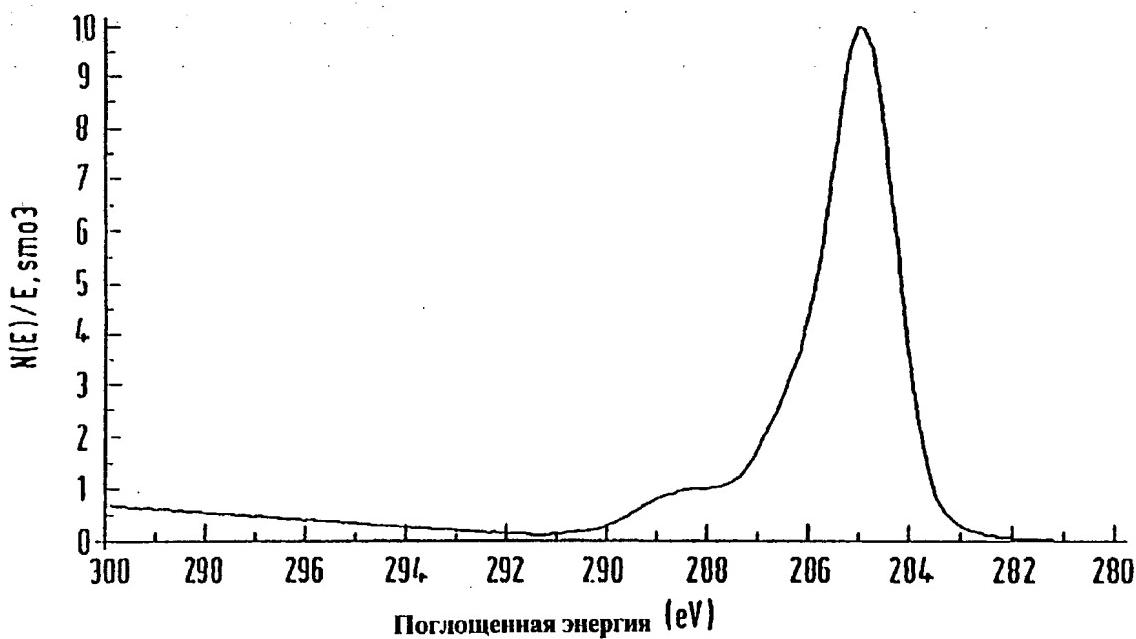
R U ? 1 7 3 5 6 3 C 2



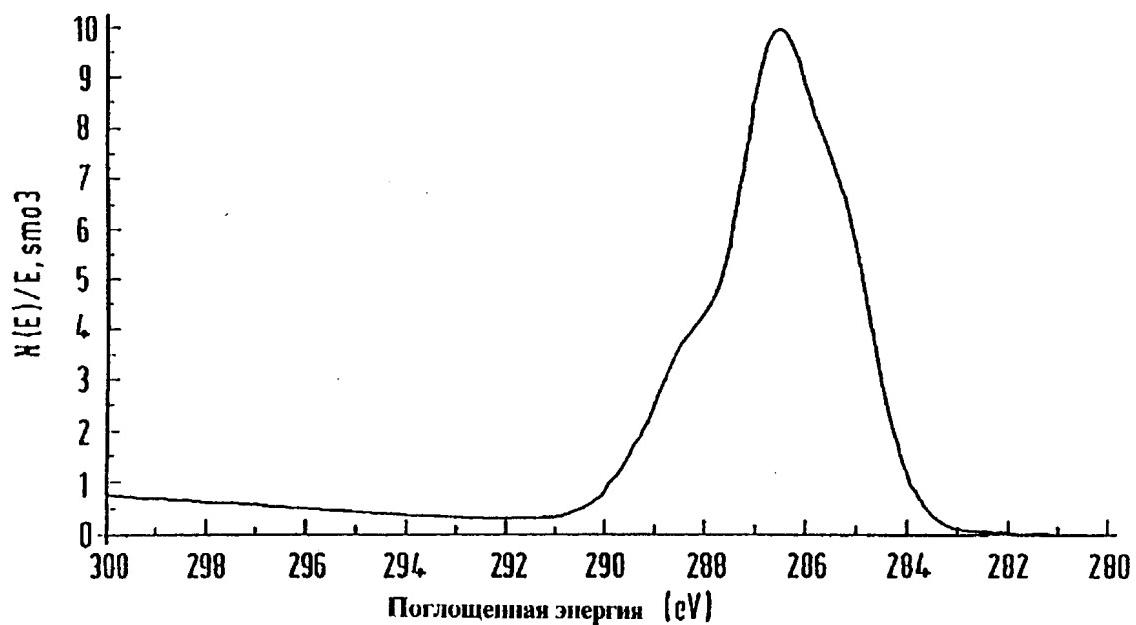
Фиг. 1б

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2



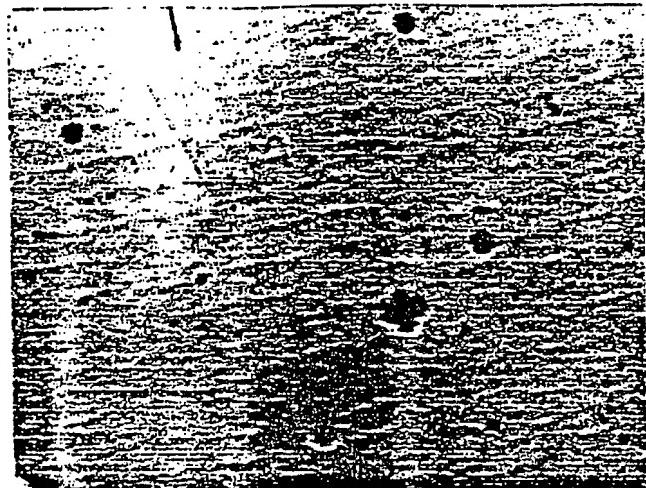
Фиг. 2а



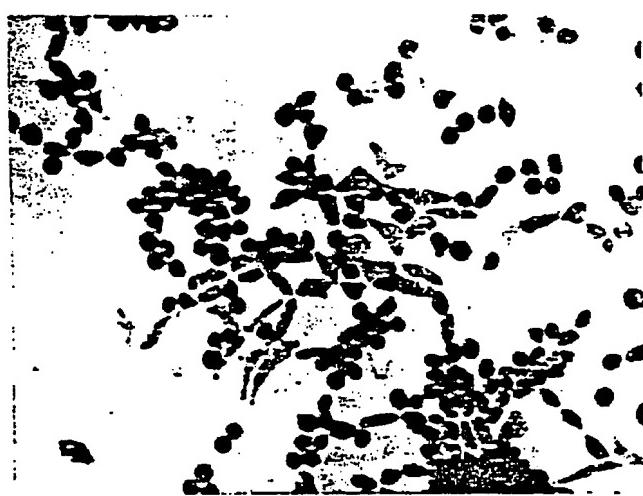
Фиг. 2б

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2



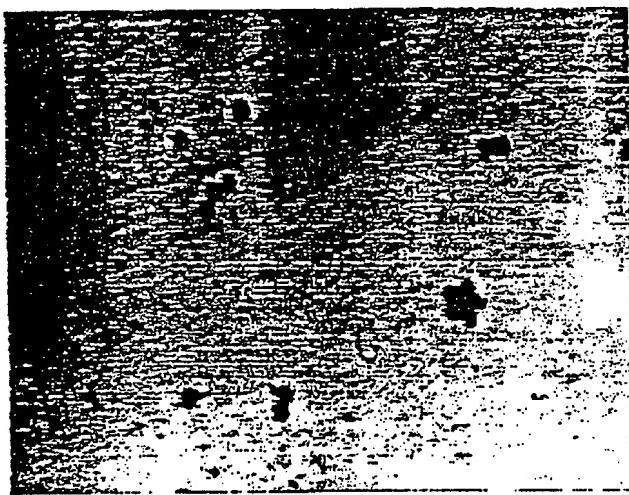
Фиг. 3а



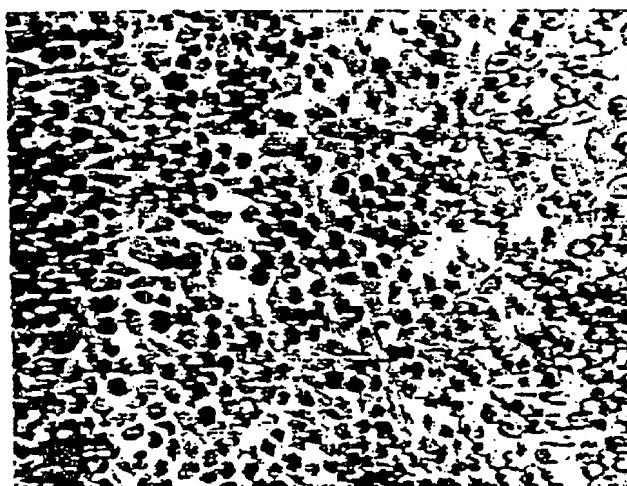
Фиг. 3б

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2



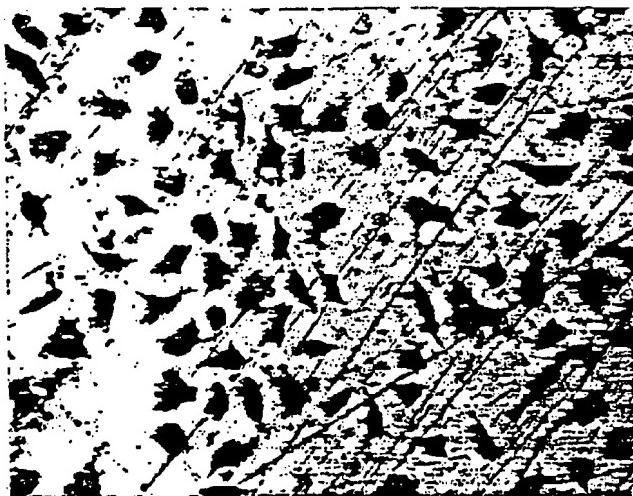
Фиг. 4а



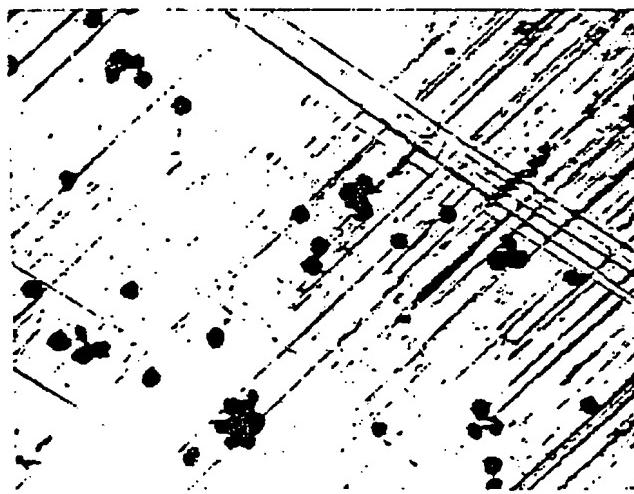
Фиг. 4б

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2



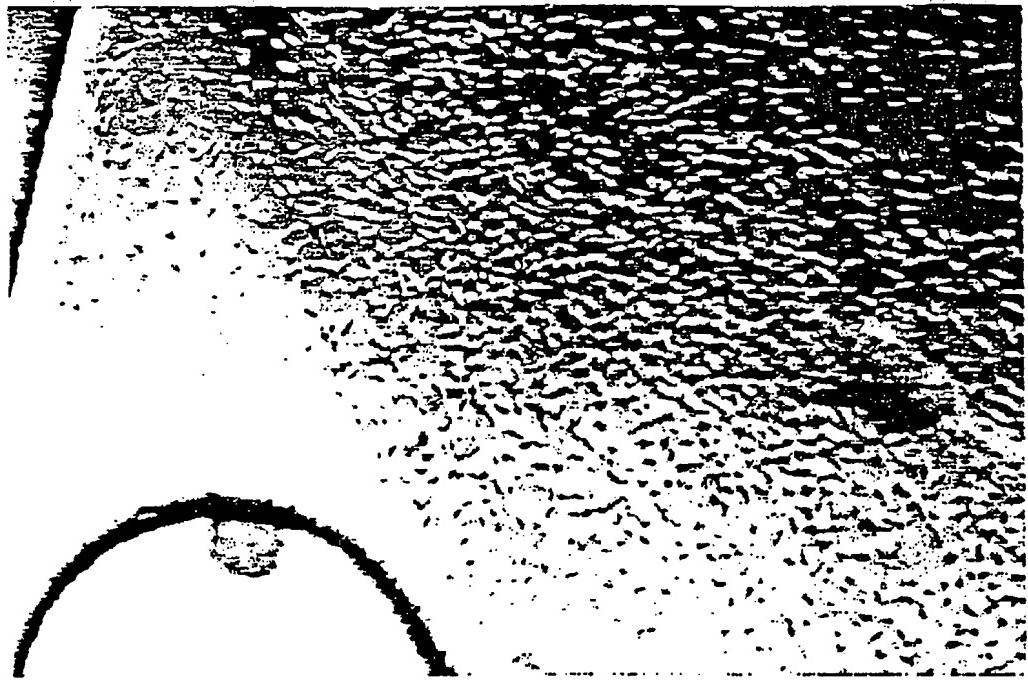
Фиг. 5а



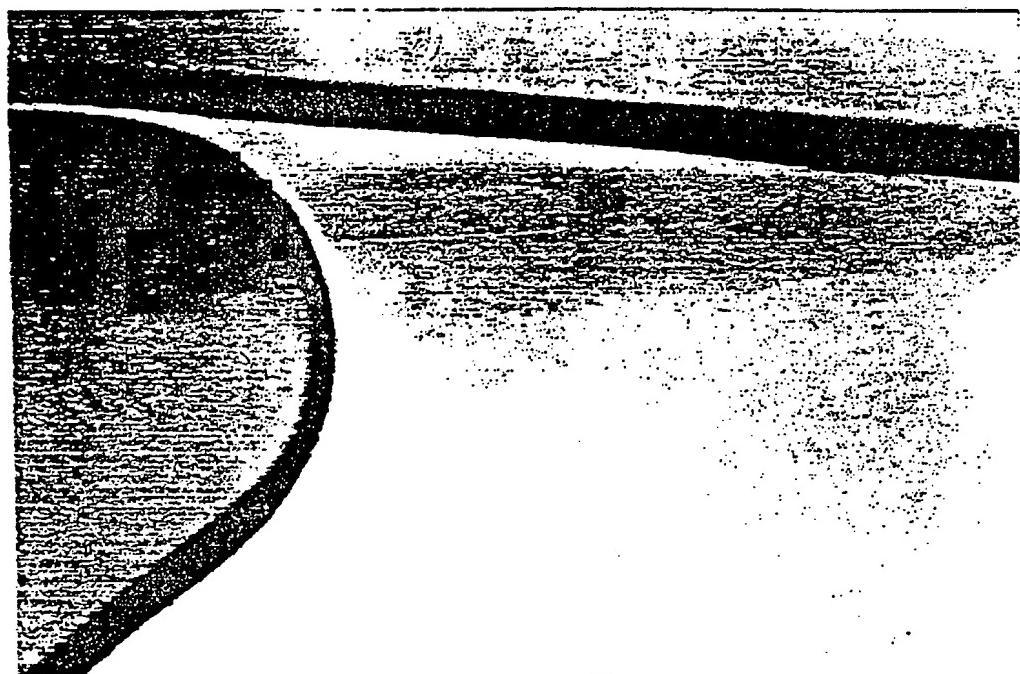
Фиг. 5б

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2



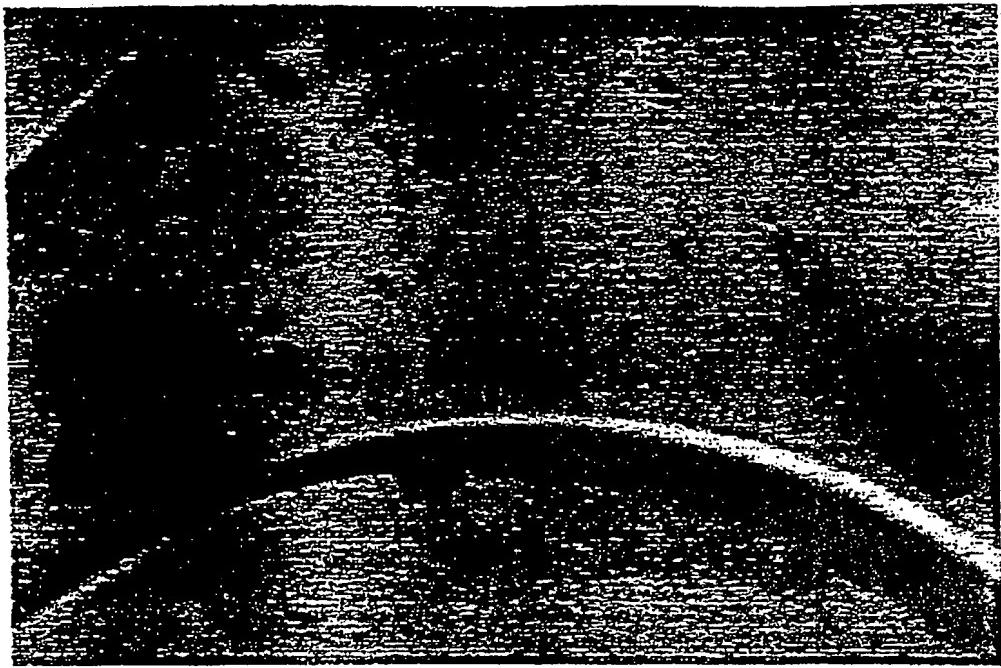
Фиг. 6а



Фиг. 6б

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2



Фиг. 7а



Фиг. 7б

R U 2 1 7 3 5 6 3 C 2